



TITLE:

計画:10-4 優位サルと劣位サルのストレス反応(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

木村, 和正

CITATION:

木村, 和正. 計画:10-4 優位サルと劣位サルのストレス反応(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1994, 24: 70-71

ISSUE DATE:

1994-11-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164570>

RIGHT:

3頭のニホンザルにGO/NO-GO課題を学習させ、オーバートレーニングしてから脳組織を採取した。脳組織は採取後すぐに領野に切り分けて凍結保存し、AGPC法で領野ごとに総RNAを抽出し、ノーザンブロッティングを行った。内部コントロールとしてG3PDHのmRNAを測定し、データの標準化を行った。

以前に報告した学習をしていないサルと同様に学習をしたサルでも全体の傾向としては第一次感覚野のOCとPCではGAP-43mRNAは少なく、連合野で多い傾向があった。視覚情報処理が高次になる経路のOCからOB、OA、TE、TGと進むに従い順次GAP-43mRNA量が増えていた。

学習をしたサルのGAP-43mRNA量を課題遂行に使用した手と同側、反対側に分けて比較すると前頭前野弓状部と運動前野腹外側部の2つの領野で反対側の方が同側よりも多いという傾向が見られた(Wilcoxonの符号付き順位検定で有意)。前頭葉の他の領野ではいずれも課題に用いた手と同側と反対側でGAP-43mRNA量に有意な差はなかった。

弓状部はピククリンを使った脱抑制の実験で、運動支配がGO/NO-GO課題の学習に伴って可塑的に変化することが知られている領域であり、また、課題学習に伴って関連ニューロンが増加する領域である。弓状溝後壁の運動前野はPetridesの一連の破壊実験からGO/NO-GO課題の学習に必要な領域であることが示されている。今回これらの領域で差が検出できたことは学習に伴う機能的な変化が構造変化に基づいている可能性を示唆する。

計画：10-3

サル腎臓に特異的なジヒドロジオール脱水素酵素の構造と機能

原 明・中山俊裕・出屋敷嘉宏(岐阜薬大)

芳香族炭化水素のジヒドロジオール誘導体をカテコール体に酸化するNADP⁺-依存性のジヒドロジオール脱水素酵素は、多くの動物組織では単量体であり、生理的にはヒドロキシステロイド脱水素酵素として機能していると報告されている。これらの単量体酵素と異なるサブユニット分子量39,000の二量体酵素がサルの腎臓に高濃度存在するが、薬物代謝以外の役割は明らかでない。この

特異的なサル腎の二量体ジヒドロジオール脱水素酵素の構造と機能を明らかにする目的で、本年度は本酵素の一次構造と生理的基質について検討した。

ニホンザル腎から精製した本酵素をエンドプロテアーゼで消化後、逆相HPLCで単離したペプチドのアミノ酸配列を気相シーケンサーで決定し、123残基からなる内部配列を明らかにした。ホモロジー検索では本酵素は既報の単量体ジヒドロジオール脱水素酵素や機能的に関連する脱水素酵素のいずれとも相同性が認められないタンパク質であることが示唆された。本酵素cDNAのクローニングは現在進行中である。

本酵素の生理的基質として、種々の生体内因性アルコール類およびカルボニル化合物を検討した結果、生体内メイラード反応の主要な反応性中間体の一つとして知られている3-デオキシグルコソンのNADPH存在下本酵素によって強く還元されることを見出した。3-デオキシグルコソ還元酵素活性はサルの組織では腎臓に著しく高く、腎臓から3種の本還元酵素を単離した。同時精製、精製酵素の酵素化学的および免疫化学的性質の解析から、このうち主酵素は二量体ジヒドロジオール脱水素酵素、マイナー酵素の二種はアルデヒド還元酵素とアルドース還元酵素であることを同定した。さらに、二量体ジヒドロジオール脱水素酵素の3-デオキシグルコソンに対する触媒効率は精製したサル腎や他の動物肝のアルドーケト還元酵素および単量体ジヒドロジオール脱水素酵素より高く、サルでは、本酵素がメイラード反応の制御酵素として重要な役割を果たすことが示唆された。

計画研究：10-4

優位サルと劣位サルのストレス反応

木村 和正(国立精神・神経センター
精神保健研究所 心身医学研究部)

3才の赤毛ザルのオス3匹を用い、その2匹づつを組み合わせ、一定時間同居させた際のストレス物質(ACTH, コルチゾル)の時間変化を調べた。同時に行動観察を行い、順位の優劣を判定した。

A, B, Cの3匹のサルの順位は、行動観察により以下のように判定した。AとBの組み合わせでは、最初A>Bの順であったが、一時Aは食欲

低下と共にやせが目立ち、 $B > A$ となり、その後 $A \approx B$ となった。A、CおよびB、Cに関しては、明らかに $A > C$ 、 $B > C$ の順であった。同居時のACTHの変化は、いずれの組み合わせにおいても、優位と判定された個体で一過性のピークがみられ、一方劣位と判定された個体では、抑制あるいは無反応と考えられる経過が認められた。しかしながら、同居を二日にわたり二回繰り返した場合、ACTHの反応は、優位劣位間で差がなくなり、同じように抑制あるいは無反応となった。次に、コルチゾルの反応は、ACTHの変化と平行することもあるが、又全く異なった変化を示すこともあり、相対的な関係がACTHの場合と逆転するものも認められた。

一般に、ストレス時における生理的反応は、視床下部-下垂体-副腎系を通じて生ずることが知られており、いかなる個体においても、この反応が普遍的に起こると考えられている。確かに、拘束、寒冷、電気ショックなど、種々の物理的ストレスに対する反応では、個体間に定性的な差はみられていないが、本研究において、コミュニケーションの場におけるストレス状況下で個体間に著しいストレス反応の差が認められたことは、新しい知見である。劣位サルにおける反応の抑制あるいは無反応は、視床下部あるいは下垂体での抑制的反応の存在をうかがわせ、ストレス疾患（心身症）との関連においても、今後さらに検討すべきものとする。

計画：10-5

機械刺激に対するサル血管内皮細胞の反応

成瀬 恵治

（名古屋大学医学部第二生理学教室）

サル血管内皮細胞を分離培養し、その種々の刺激に対する反応を細胞内カルシウム動態を指標として評価するとともにヒトで得られたデータと比較した。

<方法>

ヒト内皮細胞はサイ帯静脈より酵素的に分離した。サル血管内皮細胞は実験殺によるサルの胸部大動脈、腹部大動脈より剥離法にて分離し培養した。サル血管内皮細胞は昨年度報告したようにヒト内皮細胞用培地（EGM-UV、三光純薬）にて継代培養した。

細胞内カルシウム測定は定法に従い、Fura2/AMを用いた顕微測光を行った。機械刺激としては低浸透圧法を、またATPに対する反応も観察した。

<結果・考察>

低浸透圧刺激（50%）に対しては一過性の細胞内カルシウム上昇とそれに引き続く持続的な上昇がみられ、刺激を停止するとともにもとのレベルに戻ることが観察された。これはヒト血管内皮細胞で既に報告した反応と酷似しており、細胞外液カルシウムに依存性し、またガドリニウムで抑制された。細胞外にATPを投与してもヒト血管内皮細胞同様に一過性の細胞内カルシウム上昇と持続相からなる反応が得られた。これらの反応では内皮細胞採取部位による有意な差は見られなかった。

計画：11-1

リボソームRNA遺伝子の変異に基づく霊長類の系統分類

鈴木 仁（東京慈恵会医科大学・医科研）

本研究は簡便法であるリボソームDNA（rDNA）のスペーサー上の制限酵素断片長の多型性（RFLP）を指標とし、霊長類の系統分類学的類縁関係を明らかにすることを目指しており、昨年度はヒトをはじめとする大型霊長類の一群の類縁関係を解析した。本年度は形態学的に16-19種に分類されているマカク属に焦点を当てた。

rDNAのスペーサー上のRFLPの系統分類学への応用にあたり有利な点としては、（1）進化速度が早く、近縁種間の関係に適用可能、（2）ゲノム内でのコピー数が多いので、一個体から得られる情報量が多い、（3）同一交配集団内で協調進化をしているので、同一集団内での個体間変異は少ない、従って調べる個体数は少なくともよい、（4）核ゲノムの変異を反映している、（5）方法が簡便である、などが挙げられる。

12種の制限酵素を用い、サザンブロット解析を行い、制限酵素地図を作成した。それをもとに塩基置換度を推定した。Foodenに従ってマカク属を19種に分類すると、これらは3つの大きなグループに分けることができた。（A）バーバリーマカク、（B）ブタオザル類（ブタオザルとスラウエシ島の7種）、（C）アカゲザル類（ニホンザ